

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-321700

(43)公開日 平成4年(1992)11月11日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 15/10		7731-4H		
A 61 K 35/78	A C J C	7180-4C		
C 07 K 3/02		7731-4H		
3/16				
3/24				

審査請求 未請求 請求項の数7(全4頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-110814

(22)出願日 平成3年(1991)4月17日

(71)出願人 000162412 協同乳業株式会社 東京都中央区日本橋小網町17番2号
(72)発明者 大石 一二三 東京都練馬区関町1-27-6-303
(72)発明者 桐原 修 東京都立川市柴崎町4-11-6-101
(72)発明者 服部 隆史 東京都小平市上水本町5-1-19-205
(72)発明者 谷 久典 東京都保谷市本町6-10-30 協同乳業武藏野寮
(74)代理人 弁理士 石山 博 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】リバーゼインヒビターの製造法

(57)【要約】

【目的】ヒト及び動物の胃及び肺液由来リバーゼを特異的に阻害するインヒビターを得る。

【構成】穀類又は豆類から限外濾過法又は等電点分画により製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 谷類からヒト及び動物の胃及び胰液由来リバーゼを特異的に阻害するインヒビターを、限外濾過法により得ることを特徴とするリバーゼインヒビターの製造法。

【請求項2】 前記リバーゼインヒビターをpH5.0～5.7の範囲により、等電点分画により得ることを特徴とする請求項1記載のリバーゼインヒビターの製造法。

【請求項3】 前記リバーゼインヒビターを、豆類から限外濾過法で得ることを特徴とする請求項1記載のリバーゼインヒビターの製造法。

【請求項4】 前記リバーゼインヒビターを、豆類からpH5.2～6.0の範囲で等電点分画により得ることを特徴とする請求項1記載のリバーゼインヒビターの製造法。

【請求項5】 硫安飽和濃度10～20%により、リバーゼを沈殿除去することを特徴とするリバーゼインヒビターの製造法。

【請求項6】 限外濾過の際、0.5～1.0MのNaC1等の中性塩を用い、アミラーゼ等リバーゼインヒビターに解合している酵素類を除去することを特徴とする請求項1又は3記載のリバーゼインヒビターの製造法。

【請求項7】 入口温度130°C以下、出口温度60°C以下の条件下に、リバーゼインヒビターを噴霧乾燥機を用いて粉末化することを特徴とするリバーゼインヒビターの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 哺乳類の消化酵素類に対するインヒビター類が、植物種子類中に存在することは、従来、よく知られている。これらの中でも特に、プロテアーゼやアミラーゼに対するインヒビターは広く研究されており、それらの製造についても様々な方法が報告又は実用化されている。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、リバーゼインヒビターに関する研究によれば、種子や或る種の微生物が産生することは知られているが、その単離、精製法については殆んど研究されていない。わずかにS.Matsushitaら (Agr. Biol. Chem. 38, 97-101, 1974) が、大豆から硫安による塩析法により分離しているが、この方法によるリバーゼインヒビターは、大量のα-アミラーゼを含んでおり、純度に解決を要する課題を残している。

【0003】

【課題を解決するための手段】 ここにおいてこの発明は、穀類又は豆類からヒト及び動物の胃又は胰液由来リバーゼを特異的に阻害するインヒビターを、限外濾過法又は等電点分画により得ることを特徴とするリバーゼインヒビターの製造法を提供するものである。

10

20

30

40

50

【0004】

【作用】 発明者らは、従来種子由来の種々の酵素阻害物質を検討しており、豆類や穀類からのリバーゼインヒビターの製造法について検討を加え、リバーゼインヒビターと挙動を共にするα-アミラーゼをNaC1などの中性塩を用いて、両者の非特異的インタラクションを解離させることにより、プロテアーゼ、リバーゼ、α-アミラーゼを全く含まず、またプロテアーゼやα-アミラーゼのインヒビターを全く含まないリバーゼインヒビターの製造法を発明したものである。

【0005】

【実施例】 次にこの発明を、種々の例について詳細に説明する。

例1 (小麦からのリバーゼインヒビターの製造法)

1Kgの小麦を3Lの10%飽和の硫安と50mMの酢酸カルシウムを含む0.1Mトリス、塩酸緩衝液(pH7.2)中に、室温で一夜浸潤し、マスコロイダー(増幸産業社製)で粉碎し、抽出液を得た。これを遠心分離又は濾過により清澄化し、分画分子量150Kdの限外濾過モジュール(旭化成社製)に負荷し、濾液を集めた。これにNaC1を最終濃度が0.75～1.0Mになるように加え、分画分子量50～70Kdの限外濾過モジュール(旭化成社製)を用いて分別し、分子量50～70Kd以上の画分を集めた。この画分を常法により凍結乾燥するか、又は入口温度130°C以下、出口温度60°C以下の条件により噴霧乾燥した。この製法行程を用いてリバーゼインヒビターを調製する場合、出発原料として全小麦のほかに、フスマ、小麦粉、全米、米糠、米粉及びその他の穀類やそれらの粉を用いることができる。

【0006】 例2 (豆乳からのリバーゼインヒビターの製造)

1Kgの大豆を3倍量の水に一夜温潤し、マスコロイダー(増幸産業社製)を用いて粉碎し、豆乳を得た。この豆乳のpHを塩酸でpH4.0に調整し、遠心分離により大豆ケイシンを除去した。これに硫安を飽和濃度が10～20%になるように加え、遠心分離により沈殿物を除去した。得られた上清液を分画分子量150Kdの限外濾過モジュール(旭化成社製)に負荷し、濾液を得た。これにNaC1を0.75～1.0Mになるように加え、分画分子量50～70Kdの限外濾過モジュール(旭化成社製)を用いて分別した。分子量50～70Kd以上の画分を集め、例1に記載の条件により粉末化した。

【0007】 例3 (大豆粒からのリバーゼインヒビターの製造)

大豆粒を、2～3倍量の10～20%飽和濃度の硫安と、0.75～1.0MのNaC1を含む0.15Mのクエン酸緩衝液(pH4.0)に、一夜温潤し、マスコロイダー(増幸産業社製)を用いて粉碎し、直接リバ-

ゼインヒビターリツチ画分を抽出した。これを遠心分離またはフィルタ漏過により清澄化した後、例2に記載の方法により処理し、例1に記載の条件により粉末化した。例2と例3の製造行程は、大豆ばかりではなく、出発材料として他の豆類を用いても同様に、リバーゼインヒビターを得ることができる。

【0008】上記例1及び例2の純度、収量と活性を表1に、理化学的性状を表2に示した。

表1 (小麦及び大豆からのリバーゼインヒビターの収量とその活性)

原料	純度(%)*	収量(%)	活性(units/mg)**
小麦	92.5	0.3	31.3
大豆	87.3	0.47	21.8

*: ゲル漏過法により算出した。

10

**: 活性測定には基本的にリバーゼ測定キット(大日本製薬)を用いた。

すなわち、豚臍液由来リバーゼ(Sigma社製)と、リバーゼインヒビターを37°C、30分間ブレンキンキュベートし、合成基質を加え攪拌した後、37°C、30分間インキュベートした。反応停止液を加えて反応を停止させた後、412nmの吸光度を測定して、残存リバーゼ活性を測定した。リバーゼは1%牛血清アルブミンと5mM酢酸カルシウムを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)に溶解した。リバーゼインヒビター活性は、リバーゼ1 unitを50%阻害する量を1 unitとした。

【0009】

表2 (小麦及び大豆由来リバーゼインヒビターの理化学的性状)

原料	等電点(pH)*	分子量(Kd)**	熱安定性***
小麦	5.0~5.7	70	85°C, 40min
大豆	5.2~6.0	85	85°C, 40min

*: 等電点はpH範囲3~10のキヤリアンホライン(バイオラツド社製)と等電点分画装置(ロトフォア、バイオラツド社製)を用い、常法で行なつた。

**: 分子量はゲル漏過法で測定した。分子量標準としてカタラーゼ(240Kd)、アルドラーーゼ(180Kd)、牛血清アルブミン(67Kd)、キモトリプシン(25Kd)及びサイトクロームC(12.7Kd)を用いた。またキヤリア緩衝液は、3Mグアニジン塩酸を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)※

20※でありゲル漏過担体はショウデツクスGL520である。

***: リバーゼインヒビターを脱イオン水に5mg/mlになるように溶解し、85°Cの温浴中で加熱した。10分間隔で同一溶液からサンプリングし、直ちに冰浴中で冷却し、残存リバーゼインヒビター活性を測定した。残存リバーゼインヒビター活性が95%までを熱安定とした。

【0010】

表3 (小麦及び大豆リバーゼインヒビター画分の酵素及びインヒビター活性)

酵素又は阻害物質(unit/mg)	小麦	大豆
リバーゼ	0	0
リバーゼインヒビター	31.3	21.8
プロテアーゼ*	0	0
プロテアーゼインヒビター**	0	0
アミラーゼ***	0.3	0.4
アミラーゼインヒビター****	0.5	0.9

*: プロテアーゼ活性は、Hagiwara H.ら(Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 988, 1980)の方法に基づいた。

**: プロテアーゼインヒビター活性は、Hagiwara H.ら(Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 988, 1980)の方法に準拠した。

***: アミラーゼ活性は、アミラーゼB-テストワコ(和光純薬社製)の方法に基づいた。

****: アミラーゼインヒビター活性は、アミラーゼB-

テストワコ(和光純薬社製)の方法に基づいた。

【0011】例4 (リバーゼインヒビターの噴霧乾燥) 例1と例2で得たリバーゼインヒビター溶液(ブリツス20°)を、入口温度100~180°C、出口温度35~70°C、50mmHg(一定)、流速520ml/hr(一定)の条件下において、噴霧乾燥機(ヤマト科学社製)で乾燥した。この結果を表4に示す。

表4 (リバーゼインヒビターの噴霧乾燥による活性の変化)

入口温度(°C)	出口温度(°C)	リバーゼインヒビター活性(%)*
小麦	大豆	
100	40	110
105	40	110
		117

5

6

110	45	108	110
115	50	109	110
120	55	101	98
125	60	98	99
130	60	93	90

*:リバーゼインヒビター活性は凍結乾燥したものを100%として算出した。

【0012】上記例では小麦及び大豆を用いたが、これはこの発明によるリバーゼインヒビターの製造法を説明するためだけのものであり、上記例で用いたものばかりにいかなる穀類や豆類も使用可能である。また上記実施例で用いた試薬や装置も、この発明を説明するためだけのものであり、これらの使用を特に限定するものではない。

【0013】

【発明の効果】この発明によれば、上述のように、穀類又は豆類から、ヒト及び動物の胃及び脾液由来リバーゼを特異的に阻害するインヒビターを限外濾過法により得ることができ、この方法によれば、プロアーゼ、リバーゼ、 α -アミラーゼ及びそれらのインヒビターを全く含まない純度の高いリバーゼインヒビターが得られるものである。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
 C 07K 3/26
 C 12N 9/99

(72)発明者 野々村 一彦
 埼玉県狭山市入間川1545-27